

## ヒト正常食道上皮細胞の培養

著者	片山 正文
号	1822
発行年	1986
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/19965">http://hdl.handle.net/10097/19965</a>

氏 名（本籍）	かた 片	やま 山	まさ 正	ふみ 文
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	医	第	1 8 2 2	号
学位授与年月日	昭 和 6 1 年 9 月 1 0 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
最 終 学 歴	昭和 5 4 年 3 月 東北大学医学部医学科卒業			
学 位 論 文 題 目	ヒト正常食道上皮細胞の培養			

（主 査）

論文審査委員 教授 堀 内 藤 吾      教授 坂 本 澄 彦

教授 伊 藤 恒 敏

# 論文内容要旨

## 緒言

近年ヒト細胞の培養に関する報告は増加しつつあるが、正常消化管上皮細胞に関しての報告は少ない。ヒト正常食道上皮細胞 (human esophageal epithelial cells, HEE) に関しても、同様に報告は極めて少なく、その培養法の開発の望まれるところである。HEE の初代培養に関しては既に報告をした。初代培養はほぼ確実にこなえる様になったが、5—7 分裂で細胞は分化し増殖が止まり、実験系としては不十分なものであった。その後検討を重ねた結果、無血清の条件下で、bovine brain extract (BBE) を添加すると良好な HEE の増殖が得られる事がわかった。その他数種の因子についても検討を加え、HEE の研究に十分有用な培養系を開発する事ができた。ここに新しい培養系を示すとともに、HEE の増殖に関わる諸因子について検討した結果を報告する。

## 材料および方法

無血清培地 R I T C 80—7 培地よりカルシウムを除去し、プロリンを 175 mg / 1 に増量した; modified R I T C 80—7 培地。これに 100 mg / 1 の B B E と 5 g / 1 の bovine serum albumin (B S A) を加えた培地 (modified R I T C 80—7 + B B E + B S A 培地) を H E E の培養に使用した。dish は type I collagen で処理したものをを用いた。食道癌手術によって得られた標本より、正常部食道上皮を採取し、以前に報告した方法に従って初代培養を行なった。翌日 modified R I T C 80—7 + B B E + B S A 培地に液がえし、以後この培地で維持した。初代培養は 1 : 4 で継代し、2 代目の細胞を実験に使用した。

## 結果

B B E には用量依存性の、H E E に対する増殖促進効果が認められた。また H E E の増殖には B S A が不可欠であり、至適濃度は 5 g / 1 であった。B S A はカルシウムの担体であり、カルシウムを少量を含んでいる。そのため、カルシウム不含の modified R I T C 80—7 培地に B S A を加えた場合、少量のカルシウムが測定された (0.037 mM)。これに塩化カルシウムを種々の濃度で 1.8 mM まで加え、H E E の増殖と分化に対する影響を調べた。このカルシウム濃度の範囲では増殖に顕著な差はなかったが、形態上で大きい変化が認められた。カルシウムが低濃度の場合は、細胞は分散しているが、濃度を増加させると、細胞は密に配列し、重層する。このような分化していく条件は、長期継代に適していないので、カルシウムは通常添加しないこととし

た。R I T C80—7 培地のL—プロリン濃度は他の無血清培地と比べると低い。H E E は高濃度のL—プロリンを要求しており、これを増量した。細胞の接着に関して fibronectin , type I collagen , type IV collagen , ラミニンを検討した。H E E の接着は type I collagen と fibronectin によって増強された。酸素濃度の影響を検討したところ、低酸素の方で良好な増殖傾向をしめした。E G F は種々の細胞に増殖促進効果をもっていると言われている。H E E の場合、低カルシウム濃度では E G F は幾分増殖抑制的であった。しかしながら塩化カルシウム 1.8 mM の条件では、増殖促進的に働いた。以上の種々の検討を加えてきた結果、H E E 用の培地として modified R I T C80—7 + B B E + B S A 培地が出来上がった。細胞数増加時間は約30時間で、良好な増殖が示された。継代実験の結果、4—5 継代、30—40日、12—17分裂の継代培養が可能であった。この培地に牛胎児血清を添加すると、濃度依存性に H E E の増殖を阻害した。血清添加により、H E E の形態も変化してきた。細胞は重層し、いわゆる分化した状態になってきた。

## 考 察

H E E の培養の報告は少なく Banks — Schlegel の一連の報告が認められる程度である。他の癌同様、食道癌に関しても細胞培養を用いた研究は今後更に必要性が高くなって来る事と思われる。その際対照となる正常上皮細胞を培養し、その性状を理解する事も重要となってくる。今回報告した培養系は H E E に関する種々の研究（増殖、分化、発癌、老化等）に有用であり、また癌細胞研究の際の対照として大きく貢献するものと考えられる。

## 結 語

無血清培地 R I T C80—7 を用いて H E E 用の培地を開発した。H E E の増殖および接着に関する検討で次の様な各因子の効果が確認された。

- 1) B B E は H E E の増殖を大幅に促進した。
- 2) B S A は H E E の増殖に不可欠であった。
- 3) type I collagen および、fibronectin は H E E の接着を促進した。
- 4) カルシウム濃度を低下させること、L—プロリンを増量すること、低酸素の環境で培養することで、よりよい増殖を得ることができた。
- 5) この培養系では、血清添加は H E E の増殖を阻害するものであった。

今回開発された培地で、H E E は良好な増殖を示し、12—17分裂の継代が可能となった。本培養法は H E E の研究に大きく貢献するものと考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

癌研究において、細胞培養の技術は重要なものとなってきた。食道癌に関しても、株細胞を用いた研究は行なわれてきたが、その対照となるヒト正常食道上皮細胞 (human esophageal epithelial cells, HEE) の培養の報告は極めて少ない。今後、食道癌の研究をすすめていくうえで、HEE の培養系を確立し、その性状を調べる必要がある。著者らは既に HEE の初代培養法を開発し報告しているが、以前の培養系では細胞は分化し増殖が止まり、実験系としては不十分であった。本研究では、無血清培地をもちい、HEE の増殖、接着、分化等に関して種々の因子を検討し、HEE 用の培地を開発している。

細胞増殖に係わる因子として、bovine brain extract は HEE の増殖を大幅に促進すること、bovine serum albumin もまた細胞増殖に不可欠である事を報告している。更に、細胞接着の基質あるいは接着因子として type I collagen および fibronectin が優れており、また L-プロリンを増量すること、低酸素の環境で培養することで、よりよい増殖を得ることができたとしている。カルシウム濃度は HEE の形態に大きな影響をおよぼし、カルシウム濃度を高くすると細胞が重層し、いわゆる分化傾行を示すことも報告している。各種因子の検討の結果、HEE の増殖を促進し、分化を抑える条件のもとで、HEE は良好な増殖を示し (細胞数倍加時間; 約30時間)、数回の継代 (12-17分裂) が可能となっており、実験系として十分価値がある。この培養系では、血清添加は HEE の増殖を大きく阻害するものであったとしているが、従来細胞培用に多用されていた血清が増殖阻害的に働いているのは興味深い。これら各種因子の HEE に対する効果の知見は新しく、今後 HEE の増殖と分化の研究の基礎となるものと思われる。

HEE の無血清培養の報告は他になく、この培養系は HEE に関する種々の研究に十分有用であり、また癌細胞研究の際の対照として大きく貢献するものと考えられ、本研究は学位授与に値するものと認められる。